

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700395

研究課題名（和文） 血管を軸とした神経回路形成促進機構の統合的理解

研究課題名（英文） The role of vascular formation in the central nervous system disease

研究代表者

村松 里衣子（MURAMATSU RIEKO）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90536880

研究成果の概要（和文）：血管は、傷害後の組織を治癒する働きを持つ。本研究では、脳脊髄組織における血管の増生が、神経組織修復を促す可能性を検証した。中枢神経傷害モデル動物を用いた解析から、血管が放出する因子が神経組織を再生させることが示唆された。また、神経組織修復に関わる分子メカニズムを同定した。本研究から、中枢神経傷害後の組織修復ならびに神経症状改善に関わる分子機構の一端が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Neovascularization has been considered beneficial in delaying the development of disease. In this study, we investigate the role of angiogenesis in wound healing in the central nervous system (CNS) after injury. We found that some molecules from vascular endothelial cells promote neuronal development. This finding may contribute to develop therapy of CNS diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：神経回路、軸索

1. 研究開始当初の背景

末梢神経は損傷を受けても再生するが、中枢神経は再生しない。脳血管障害や脳脊髄損傷により、中枢神経系は傷害された場合、神経機能は失われてしまう。この重篤な症状は自然回復しない。失われた機能を再獲得するには、損傷を受けた神経回路が再建することが不可欠である。これまでに、中枢神経の再生を阻害するメカニズムが国内外で報告されており、その分子群の作用を弱めることで、

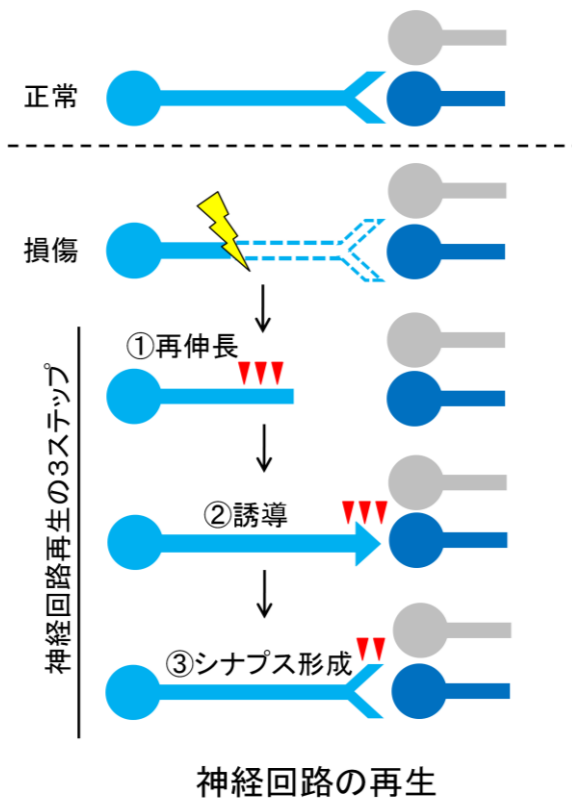
一定の神経再生効果、および治療効果が報告されてきた。

しかし、このような処置を施さなくとも、近年では中枢神経も、部分的ではあるが、わずかに自然に再生して、症状を軽快させと、様々な動物モデルで報告されてきた。このことから、生体内には、神経組織の再生を促進させるメカニズムも備わると考えられるが、その本体をはじめ、神経組織を自然に再生する分子メカニズムに関しても、全く明らかに

なっていない。

生体内の多くの臓器において、病変に形成する新生血管は、組織修復をうながすと考えられている。脳脊髄の損傷モデルにおいても、血管の幹細胞や血管新生因子を処置することで、血管が増え、損傷による症状が軽快すると報告されている。ここから、損傷を受けた神経組織が修復したと予想されるが、その点に踏み込んだ知見はなかった。

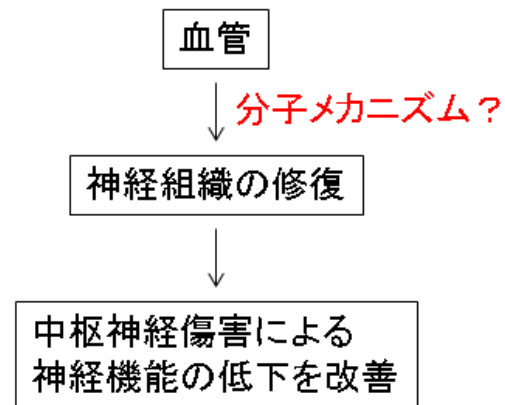
血管と神経の相互作用に関する研究は、末梢神経の発達に関する報告が1報あるのみであり、そこでは、血管が神経の伸長方向を制御することが明らかにされていた。しかし、神経の発達・再生には、突起の伸長と伸長した突起の方向性制御、シナプス形成など複数のステップが必要である。血管の神経回路形成への作用は、神経突起の伸長方向を制御する知見のみが報告されており、その他の関与は明らかではない。さらに、病態下の神経系、特に成体における神経回路修復については、中枢組織に限らず、末梢組織においても、血管と神経の相互作用の存在を示唆する報告はないのが現状である。



神経回路の再生には、障害を受けた神経突起の①再伸長（矢頭）の後、適切な標的細胞方向への②突起誘導（矢頭）そして標的細胞との③シナプス形成（矢頭）が必要となる。

2. 研究の目的

研究代表者らは、これまでの研究から、成体の中枢神経傷害後の神経組織の自然な再生が、病巣部に形成する血管によって促されるという実験結果を得ていた。その中で、再生した神経突起は、血管に沿うように伸長する様子を観察していた。このことから、成体中枢神経後の神経突起の伸長は、血管を足場として生じる、という仮説をたてた。そこで、本研究では、血管を足場とすることで、神経突起の伸長がうながされるか、その作用を担う細胞間接着に基づくシグナル伝達の解明を中心に、細胞培養実験を行った。



本研究では、神経組織の修復を促す分子メカニズムを解明する

3. 研究の方法

血管に接触した神経細胞が、神経突起の伸長が促進することを示すため、血管と神経の共培養実験を行った。これまでに、再生する神経突起が、脳毛細血管内皮細胞に絡み合うように伸長する様子を観察している。ここで観察した血管は、内皮細胞のみで構成されていた。そこで、血管内皮細胞と神経細胞を直接コンタクトさせる培養実験系を構築した。具体的には、ラットから脳血管内皮細胞と大脳皮質神経細胞をそれぞれ単離し、血管内皮細胞をフィーダー細胞としてその上に神経細胞を播種し、血管細胞の有無による神経突起長の変化を観察した。細胞培養後、神経細胞マーカーである抗 Tuj1 抗体で免疫染色を行い、Tuj1 陽性神経突起の長さを計測し、突起長から神経組織修復効果を評価した。

また、血管内皮細胞が恒常的に産生する分泌因子の作用を完全に排除するため、あらかじめパラホルムアルデヒドで固定した血管内皮細胞上でも、神経細胞培養を行った。この実験から、固定後の血管内皮細胞の表面に発現する因子の、神経突起伸長効果を評価することができる。本実験においても、培養後

に抗 TuJ1 抗体で免疫染色を行い、TuJ1 陽性神経突起伸長を計測した。

血管に、神経突起の伸長効果が備わることを確認したのちに、神経突起の伸長を促す血管が産生する因子の同定を網羅的に解析した。特に、血管を足場とした神経再生を評価することから、細胞間接着を担う因子を候補として、解析を行った。

4. 研究成果

ラット脳血管内皮細胞を培養し、その上にラット大脳皮質神経細胞を播種し、24 時間培養した。すると、コントロール群（血管内皮細胞なし）の神経突起と比較し、血管内皮細胞上で培養した神経突起は伸長が促進した。このことから、血管内皮細胞には神経突起の伸長する作用が備わることが示唆された。

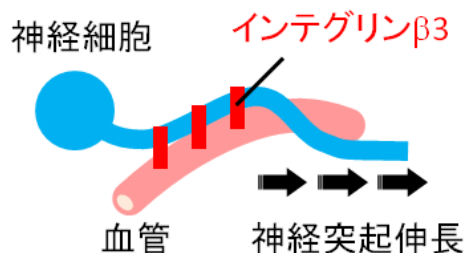
これまでの研究から、血管が産生する分泌性の分子も、神経突起の伸長を促すことを明らかにしている。そこで、血管内皮細胞をトランスウェル状に播種し、神経細胞と非接着状態で共培養した場合では、接着状態の共培養と比較し、神経突起の伸長効果に差があるかを検討した。その結果、トランスウェルを用いた共培養条件でも神経突起の伸長は促されるが、直接血管内皮細胞と神経細胞を接触させた共培養条件の方が、神経突起の伸長効果は大きかった。この結果は、血管が神経細胞と直接接することで、神経突起の伸長を促すパワーが増強したことを意味する。さらに、血管内皮細胞をあらかじめパラホルムアルデヒドで固定し、その上でも神経細胞培養を行った。この培養条件では、血管内皮細胞の分泌性因子の関与を排除できる。すると予想通り、コントロール群（血管内皮なし）と比較し、神経突起の伸長が促進された。これらの結果から、血管内皮細胞と神経細胞が直接接することで、神経突起の伸長が促されることが示唆された。

血管による、神経突起伸長効果の分子メカニズムの解明を行うため、まず細胞間接着を担う因子の関与を検証した。接着分子の多くは、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸、というアミノ酸配列を含む。血管による神経突起伸長を制御する分子群にも、上記の配列が含まれるかを検討するため、この配列を特異的に阻害するペプチド（RGD ペプチド）を用いて、血管内皮細胞と神経細胞を行った。すると、RGD ペプチドの添加量に依存して、血管内皮細胞による神経突起伸長効果が抑制された。このことから、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸のアミノ酸配列を含む接着因子が、血管内皮細胞からの神経突起伸長に関与することが示唆された。

続いて、血管内皮細胞による神経突起伸長効果を制御する接着分子の同定に進んだ。ア

ルギニン-グリシン-アスパラギン酸のアミノ酸配列は、接着分子インテグリンスーパーファミリーに属する分子群に多く認められる。また、RGD ペプチドは、インテグリンの中でも $\alpha 5 \beta 3$ というサブタイプとの結合が強固である。そこで、インテグリン $\alpha 5 \beta 3$ が、血管による神経突起伸長効果に関与すると考え、インテグリン $\beta 3$ の中和抗体を用いて、血管内皮細胞と神経細胞の共培養を行った。その結果、インテグリン $\beta 3$ の中和抗体存在下では、血管による神経突起伸長効果が抑制された。コントロール実験として、インテグリン $\beta 1$ の中和抗体を用いた培養を行ったが、神経突起伸長に対する抑制効果は得られなかった。このことから、インテグリン $\beta 3$ が、血管による神経突起伸長効果に寄与することが示唆された。

そこで、神経細胞と血管内皮細胞のどちらでインテグリン $\beta 3$ が発現しているかを検討するため、抗インテグリン $\beta 3$ 抗体を用いて両細胞の免疫染色を行ったところ、神経細胞でインテグリン $\beta 3$ の発現が認められた。このことから、血管内皮細胞に発現するインテグリン $\beta 3$ のリガンドが、神経細胞側のインテグリン $\beta 3$ に作用し、下流の細胞内シグナルを制御することで、神経突起伸長効果を促す可能性が示された。



血管は、神経細胞のインテグリンβ3を介して神経突起の伸長を促進させる。

また、その細胞内メカニズムを探索した結果、細胞内シグナルの src の関与を薬理的に解明した。

培養実験で解明してきた分子メカニズムが、実際に中枢神経傷害後の神経回路の再生に関わることを個体レベルの関与を検証した。まず、成体の中枢神経傷害モデルマウスにおける神経回路の再生と、血管の走行を観察した。神経回路は、神経細胞にトレーサーを注入して可視化し、血管は血管マーカである抗 CD31 抗体で免疫染色を行った。損傷後、時間が経つにつれて、損傷による細胞死を免れた神経細胞から、神経突起が再生する様子が観察されたが、この再生した突起は、

CD31 陽性の血管と併走する様子を確認した。

損傷後の神経突起の再生は、損傷により失われた神経機能の回復を導く。そこで、そこで、本モデルマウスにインテグリン $\beta 3$ の中和抗体を処置し、神経症状の変化に対する効果を観察した。用いたマウスでは、運動機能に障害があらわれる。そこで、マウスの運動機能を評価する行動実験を行い、神経症状への作用を検証した。本マウスでは、傷害された直後で運動機能が劇的に低下するが、時間が経つにつれて、部分的ではあるが自然に運動機能が回復していく。運動機能の回復期に、傷害部位にインテグリン $\beta 3$ 中和抗体を処置し、運動機能の回復への効果を検討した。すると、コントロール群で観察される運動機能の回復は、インテグリン $\beta 3$ 中和抗体投与群で有意に抑制された。この結果をこれまでの培養実験の結果と照らし合わせると、血管が神経細胞のインテグリン $\beta 3$ シグナルを活性化することで、個体レベルの神経突起の再生を促すこと、そしてインテグリン $\beta 3$ の作用を抑制した結果、運動機能の回復が阻害されたことが予想される。

なお、インテグリン $\beta 3$ の中和抗体を施したマウスでは、傷害を受けた病巣の大きさにも変化が認められた。このことから、培養実験で示してきた神経突起長への作用以外にも、傷害組織で観察される組織変化に影響を与えられることが推察された。

以上の研究成果をまとめる。我々は、血管が、神経突起の伸長を促す作用を持つことを見出した。その分子メカニズムに、神経細胞のインテグリン $\beta 3$ が関与することが示された。さらに、中枢神経傷害後の神経突起の再生に対してもインテグリン $\beta 3$ が作用するし、インテグリン $\beta 3$ の作用を減弱することで、傷害後の神経機能の改善が抑制されることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

①Satoko Sumimoto, Rieko Muramatsu, Sakiko Fujii, Toshihide Yamashita. Vascular endothelial cells promote cortical neurite elongation by a mechanism dependent on integrin $\beta 3$, Neuro2011, 2011年9月15日, 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村松 里衣子 (MURAMATSU RIEKO)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90536880

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：